

516, 521

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. Dezember 2003 (11.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/102588 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **G01N 33/574**,  
C12Q 1/68, A61K 31/44

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/05710

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2003 (30.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 24 534.7 31. Mai 2002 (31.05.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **DOLDERER, Jürgen** [DE/DE]; Rheingaus-  
trasse 136, 65375 Oestrich-Winkel (DE).

(74) Anwalt: **MEYER-DULHEUER, Karl-Hermann**; Met-  
zlerstrasse 27, 60594 Frankfurt am Main (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.*



**WO 03/102588 A2**

(54) Title: DIAGNOSTIC AGENT, METHOD FOR DETECTING A CARCINOMA, AND MEANS FOR THE TREATMENT THEREOF

(54) Bezeichnung: DIAGNOSTIKUM UND NACHWEISVERFAHREN FÜR EIN KARZINOM UND MITTEL ZU SEINER BE-  
HANDLUNG

(57) Abstract: Disclosed are a diagnostic agent and a method for detecting a carcinoma, according to which at least one HERG  
potassium channel is detected in a tissue sample of a human colon or rectum. Also disclosed is the use of the anti-arrhythmic agent  
E-4031 for treating a colorectal carcinoma.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Diagnostikum und ein Nachweisverfahren eines Karzinoms beschrieben, bei dem in einer  
Gewebeprobe des menschlichen Dickdarms oder Enddarms mindestens ein HERG-Kaliumkanal nachgewiesen wird. Ausserdem  
wird die Verwendung des Antiarrhythmikums E-4031 zur Behandlung des colorektalen Karzinoms beschrieben.

## 5 Diagnostikum und Nachweisverfahren für ein Karzinom und Mittel zu seiner Behandlung

10 Die Erfindung betrifft ein Diagnostikum und ein Nachweisverfahren für ein Karzinom, insbesondere auch ein Nachweisverfahren des colorektalen Karzinoms (Dickdarmkrebs) in einer Gewebeprobe des menschlichen Dick- oder Enddarms sowie ein Mittel zur Behandlung von Karzinomen, insbesondere des colorektalen Karzinoms.

15

Karzinomerkrankungen haben bekanntlich in allen Ländern eine immer größere Bedeutung erlangt. Die Behandlung von Karzinomen und ein Therapieerfolg hängen in entscheidender Weise davon ab, dass das Karzinom rechtzeitig erkannt wird. Deshalb besteht ein großer Bedarf an zuverlässigen Karzinom-

20 Diagnostika, insbesondere solchen, die den Nachweis von Metastasen und Mikrometastasen auch dann erlauben, wenn ein eindeutiger histologischer Befund noch nicht vorliegt oder der histologische Befund negativ ausfällt.

25

Das colorektale Karzinom ist die zweithäufigste Todesursache bei Krebsleiden, welches kontinuierlich in seiner Inzidenz zunimmt und häufig nach einer kurativen chirurgischen Operation wieder auftritt. Colorektale Karzinome (bösartige Dick- und Enddarmtumore) treten in den Industrieländern immer häufiger auf und stellen bei Männern das zweithäufigste und bei Frauen das dritthäufigste Krebsleiden dar. Das colorektale Karzinom macht 15% der bösartigen Neubildungen aus. Es kommen über 200.000 neue Fälle von colorektalen Karzinomen

30 im Jahr vor, wobei über 100.000 Patienten daran versterben. Das colorektale Karzinom steht somit an zweiter Stelle der Todesursachen bei Krebsleiden.

30

Ein colorektales Karzinom kann de novo oder im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz in einem adenomatösen Polypen entstehen. Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung bei Adenomen liegt zwischen 1 bis

35

5 40%. Insofern stellen Patienten mit colorektalen Polypen eine Risikogruppe dar. Aus diesem Grund ist die Früherkennung von colorektalen Karzinomen in Adenomen und die zuverlässige Differenzierung zum gutartigen colorektalen Gewebe besonders für die Prognose und den Therapieverlauf von entscheidender Bedeutung.

10

Die Diagnose und Prognose für diese Krebsart wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften, die zur Zeit der Erstdiagnose vorhanden sind, beeinflusst. Diese Faktoren beinhalten Alter, Geschlecht, Dauer der Symptome, Zustand der Darmobstruktion, Tumorlokalisation, Notwendigkeit von Bluttransfusion und die  
15 Qualität der chirurgischen Intervention. Bisher haben zwar eine Anzahl von Tumoreigenschaften, wie vaskuläre lymphatische Invasivität, Differenzierungsgrad und präoperative Titer von konventionellen Tumormarkern einen prognostischen Wert gezeigt, jedoch gibt es keine geeigneten Marker für die Detektion von Frühstadien des Karzinoms (Entartung von gutartigen colorektalen Vorstu-  
20 fen (Adenome)) oder für histopathologisch unauffällige Mikrometastasen (minimal residual disease), die der Grund für das Wiederauftreten des Karzinoms, sogar nach kurativer chirurgischer Resektion, sein können. Die bisher verwendeten Tumormarker CEA, CK 19 und CK 20 sind für die derzeitige Prognose richtungsweisend, jedoch unzuverlässig in der Diagnosedifferenzierung.

25

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein zuverlässiges Diagnostikum und ein Nachweisverfahren für ein Karzinom zur Verfügung zu stellen und weiterhin ein wirksames Mittel zur Behandlung eines Karzinoms zur Verfügung zu stellen. Die nachstehend beschriebenen Untersuchungen wurden am Bei-  
30 spiel des colorektalen Karzinoms durchgeführt, sind jedoch auch für die Diagnose und Behandlung anderer Karzinome anwendbar.

Zur Lösung dieser Aufgabe sieht die Erfindung vor, dass eine Gewebeprobe auf das Vorhandensein von HERG-Kaliumkanälen untersucht wird.

35

Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Diagnostikum zum Nachweis eines Karzinoms, mit dem man die Anwesenheit mindestens eines HERG-

5 Kaliumkanals in einer menschlichen Gewebeprobe, die beim gesunden Menschen frei von HERG-Kaliumkanälen ist, oder in Körperflüssigkeiten nachweist. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Diagnostizieren eines Karzinoms, bei dem man in einer Gewebeprobe, die beim gesunden Menschen frei von HERG-Kaliumkanälen ist, oder in einer Körperflüssigkeit die Anwesenheit mindestens eines HERG-Kaliumkanals nachweist.

Der Nachweis eines HERG-Kaliumkanals mit dem erfindungsgemäßen Diagnostikum ist selbstverständlich nur dann ein sicherer Hinweis auf das Vorliegen eines Karzinoms, wenn der Nachweis in einer Gewebeprobe oder in Lymphknoten vorgenommen wird, die beim gesunden Menschen frei von HERG-Kaliumkanälen sind. Das trifft nicht zu für das Herzmuskelgewebe und das Gehirn, in denen beim gesunden Menschen stets HERG-Kaliumkanäle vorkommen. Gelingt jedoch der Nachweis eines HERG-Kaliumkanals z.B. in einer Gewebeprobe des Dick- oder Enddarmes, in der bekanntlich normalerweise niemals HERG-Kaliumkanäle vorkommen, dann ist das ein sicherer Nachweis für das Vorliegen eines Karzinoms.

Der Karzinomnachweis für das Auffinden von HERG-Kaliumkanälen ist auch dann zuverlässig, wenn dieser Nachweis in einer Körperflüssigkeit, wie Blut, Blutplasma, Blutserum, Harn, Schweiß oder Tränenflüssigkeit oder auch im Stuhl gelingt, in denen normalerweise niemals HERG-Kaliumkanäle aufzufinden sind.

Ein Beispiel für das erfindungsgemäße Verfahren und Diagnostizieren eines Karzinoms besteht darin, dass man ein colorektales Karzinom diagnostiziert, in dem man in einer Gewebeprobe des menschlichen Dickdarmes mindestens einen HERG-Kaliumkanal nachweist.

Zur Diagnose wird eine Gewebeprobe des Dick- bzw. Enddarmes im Labor untersucht, wobei der HERG-Kaliumkanal in colorektalen Karzinomzellen exprimiert wird, der sowohl durch die hochsensitive RT-PCR-Methode als auch durch die in der Klinik verbreitete Immunhistochemie nachgewiesen werden

5 kann. Die überraschende und wertvolle Erkenntnis besteht darin, dass der HERG-Kaliumkanal ein hochselektiver funktioneller Tumormarker für das colorektale Karzinom ist und somit in der Diagnostik, vor allen zur Erkennung von Frühstadien des Karzinoms, zum Nachweis von unauffälligen Mikrometastasen und zur Differenzierung vom gesunden colorektalen Gewebe eingesetzt werden  
10 kann.

Mitglieder der ether á go-go (EAG) Kaliumkanalfamilie, insbesondere das eag-abhängige (eag-related-gen; ERG) Genprodukt, wie der humane ERG (HERG) Kaliumkanal sind zur Diagnose geeignet. Sie konnten in verschiedenen Tumor-  
15 zelllinien unterschiedlicher Histogenese gefunden werden, wobei bekannt ist, dass sie bei der Zellproliferation und Transformation eine Rolle spielen.

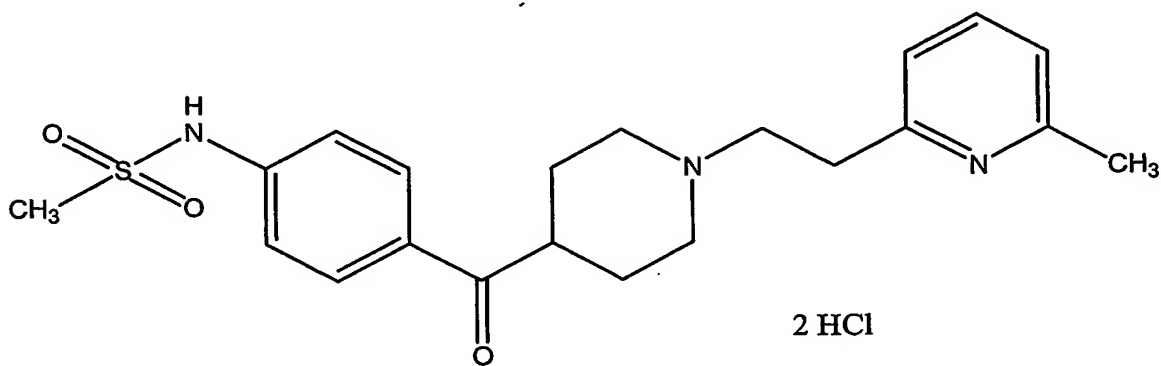
Die reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaktion, RT-PCR) ist eine sehr effiziente und hoch sensitive  
20 Methode zum Nachweis von minimaler tumor-assoziierte mRNA Transcription. Die Immunhistochemie ist in der Klinik eine gebräuchliche und weit verbreitete Methode und daher leicht in den Routineablauf zu integrieren.

Der HERG (human eag related gene) Kaliumkanal stellt einen besonderen Typ  
25 von humanem Kaliumkanal dar, der zu der eag (ether a-go-go) Familie der spannungsaktivierten Kaliumkanäle gehört. In neoplastischen Zellen unterschiedlicher Histogenese spielt der HERG- Kaliumkanal offensichtlich eine wichtige, pathophysiologische Rolle bei den Regulationsmechanismen und bewirkt ein unlimitiertes Tumorwachstum.

30 Zur Behandlung von colorektalen Karzinomzellen wird erfindungsgemäß die Verwendung des Antiarrhythmikum E-4031 vorgeschlagen. Dies beruht auf der wertvollen Erkenntnis, dass der funktionelle HERG-Kaliumkanal, der für die Zellproliferation und das Karzinomwachstum eine wichtige Rolle spielt, selektiv  
35 durch das Antiarrhythmikum E-4031 blockiert werden kann. Somit sind neue Ansätze für die Krebstherapie möglich.

5

Das Antiarrhythmikum E-4031 ist ein 4-[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinyl]carbonylmethansulfoanilid, 2HCl der Formel



10

- 5 Der Erfindung liegen folgende Untersuchungen und Maßnahmen zugrunde.

### Patienten

- 10 Es wurden 24 Gewebeproben von 18 verschiedenen Patienten (12 Frauen, 6 Männer; im Alter von 51-86 Jahren, Durchschnittsalter 67,7 Jahre) mit colorektalem Karzinom der UICC Klassifikation von I-IV untersucht. Fünf Karzinome waren im Colon, vier im sigmoidalen Colon und neun im Rektum lokalisiert. Die Gewebeproben wurden von dem umgebenden Gewebe freipräpariert, um eine Überkreuzkontamination zu vermeiden. Für jede einzelne Gewebeprobe wurde  
15 ein neues Skalpel benützt.

Die klinische und histopathologische UICC sowie Dukes Klassifikation von Patienten mit colorektalem Adenokarzinom ergab folgendes:

- |    |                                   |                    |
|----|-----------------------------------|--------------------|
| 20 | Stadium (stage) I – Dukes A : 3   | (pT1 = 1, pT2 = 2) |
|    | Stadium (stage) II – Dukes B : 5  | (pT3 = 5, pT4 = 0) |
|    | Stadium (stage) III – Dukes C : 7 | (pN1 = 4, pN2 = 3) |
|    | Stadium (stage) IV – Dukes D : 3  | (pM1 = 3)          |
- 25 Histopathologisch negative Proben von Colongewebe von 7 Patienten (4 Frauen, 3 Männer; im Alter von 60-68 Jahren, Durchschnittsalter 62,8 Jahre), wovon 3 Proben ein tubulo-villöses Adenom des Colons und 4 Proben eine Sigmavertikulitis waren, dienten als Negativkontrolle (Tabelle 2).
- 30 Die histopathologische Diagnosen, die UICC und Dukes Klassifikation sowie TNM Klassifikation wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Gewebeprobe wurde sofort nach der Exzision in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei –80°C bis zur RNA Extraktion gelagert.
- 35 Die gesamte zelluläre RNA-Isolierung wird von den gefrorenen Gewebeproben mit dem Qiagen Rneasy mini-kit nach Anleitung des Herstellers (Hilden,

- 5 Deutschland) durchgeführt. Der Gehalt und Reinheit der RNA wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

Die colorektale Karzinomzelllinie (Colo-205) wurde für die Detektion der Sensitivität dieser Experimente als positive Kontrolle verwendet.

10

### Reverse Transkription

Die cDNA wurde aus 2µg gesamter RNA in einem Volumen von 20µl Reaktionsmischung synthetisiert, welche 4µl von 5 x Reaktionspuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L KCl und 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 500 µmol/L dNTP, 100  
15 µmol/L Lösung von poly-dT15-Primer (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) und 400 Einheiten von Superscript II (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) enthält. Die Mischung wurde bei 42°C für 60 min inkubiert, für 2 min auf 90°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt.

20

### Primersequenzen für die RT-PCR Untersuchung:

Folgende Primersequenzen wurden für die anschließenden RT-PCR Untersuchungen verwendet:

25

Die Primersequenzen für die CEA mRNA waren: A, 5'-TCTGGAAGTTCTCCTGGTTCTCTCAGCTGG-3' für die outer sense; B, 5'-TGTAAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAA-3' für die antisense; und C, 5'-GGGCCACTGTCGGCATCATGATTGG-3' für die inner sense cases .

30

Die Primersequenzen für die CK-19 mRNA waren: A, 5'-GTGGAGGTGGATTCCGCTCC-3' für die outer sense; B, 5'-TGGCAATCTCCTGCTCCAG-3' für die outer antisense; C, 5'-ATGGCCGAGCAGAACCGGAA-3' für die inner sense; and D, 5'-  
35 CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3' für die inner antisense cases.



- 5 Die Primersequenzen für die CK-20 mRNA waren: A, 5'-GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG-3' für die outer sense; B, 5'-AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC-3' für die outer antisense; C, 5'-CGGCGGGGACCTGTTTGT-3' für die inner sense; und D, 5'-CAGTGTTGCCCAGATGCTTGTG-3' für die inner antisense cases.

10

Die Primersequenzen für die HERG mRNA waren:

A, primer up 5'-AGCTGATCGGGCTGCTGAAGACTG -3' und

B, primer down 5'-AATGAGCATGACGCAGATGGAGAAG-3'.

- 15 Um die Integrität der extrahierten RNA zu untersuchen und um sicherzustellen, dass equimolare RNA verwendet wurde, wurde die extrahierte RNA mit Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) mittels RT-PCR kontrolliert. Die Primersequenzen für GAPDH waren: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' sense und 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' antisense primers.
- 20

#### **Die reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR):**

- Die zweistufige RT-PCR wurde für die Amplifikation von cDNA von CEA, von CK-19 und CK-20 und von HERG verwendet.
- 25

- Die PCR wurde wie folgt ausgeführt: Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl mit 2 µg der gesamten RNA pro Probe durchgeführt. Für die erste PCR-Runde, 2 µL Aliquots der cDNA Lösung wurden mit 10,5 µL der PCR Reaktionsmischung, welche 1,25 µL 10 x PCR Puffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, und 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 200 µmol/L dNTP, 0,5 µmol/L von jedem Primer, und 2,5 Einheiten von Platinum Taq Polymerase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) enthält, gemischt.
- 30

5 Die Reaktion wurde in einem PCR Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) fortgesetzt. Für die CEA, CK-19 and CK-20 Amplifikation wurden folgende Bedingungen angewandt: Aktivierung der Taq Polymerase bei 95°C für 4 min, Template Denaturierung bei 95°C für 45 sec, Annealing bei 60°C für 45 sec und  
10 Elongation bei 72°C für 45 sec für 20 Zyklen. Die HERG-Amplifikation wurde bei 95°C, 4 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min und 95°C, 1 min für 30 Zyklen durchgeführt. Zwei Mikroliter des ersten PCR Produktes wurde in ein zweites Röhrchen transferiert und weiter amplifiziert (CEA, CK-19 und CK-20: bei 95°C, 4 min; 95°C, 45 sec; 60°C, 45 sec und 72°C, 45 sec in 20 Zyklen und HERG bei 95°C, 4 min; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min und 95°C, 1 min in 30 Zyklen). Alle Pipetierarbeiten wurden auf Eis und unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und dann  
15 die Röhrchen in den Thermocycler gegeben. Zuvor wurden sie auf die Denaturierungstemperatur erhitzt bevor die Amplifikation begann.

Die amplifizierten DNA Fragmente waren 132 Basenpaare (bp) für CEA-, 328  
20 Basenpaare für CK-19-, 485 Basenpaare für CK-20- und 386 Basenpaare für HERG-Primerpaare. Jede Gewebeprobe wurde mindestens zweimal untersucht.

Um die Integrität für cDNA zu überprüfen, wurden in 25 Zyklen die Amplifikation  
25 für GAPDH mit 603 Basenpaaren der cDNA Fragmente (95°C, 4min; 95°C, 45 sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 45 sec) durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

30

### **Sensitivitätstests der RT-PCR-Methode**

Die colorektale Karzinomzelllinie (Colo-205) diente für die Detektionssensitivität in diesen Experimenten als positive Kontrolle. Um die Sensitivität der Methode  
35 bestimmen zu können, wurden Verdünnungsreihen von  $10^6$  bis zu  $10^0$  der colorektalen Karzinomzellen (Colo-205) angefertigt, denen dann  $10^7$  Lymphozyten von gesunden Spendern zugegeben wurden. Nach der Extraktion der gesamten

- 5 RNA wurden die RT-PCR durchgeführt. Die Verdünnungsreihen der RNA zeigten, dass die Primer in der Lage waren, eine Menge mRNA, welche äquivalent zu einer Tumorzelle in  $10^6$  Lymphozyten ist, zu detektieren.

### Immunhistochemie

10

Proben von colorektalen Karzinomen und gesundem colorektalem Gewebe wurden in gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Histologie wurde an Hematoxylin und Eosin gefärbten Schnitten evaluiert. Weitere Schnitte wurden für den immunhistochemischen Nachweis verwendet.

15

Für die Immunhistochemie des Anti-HERG-Antikörpers wurde ein Protokoll der ABC (Avidin-Biotin-Peroxidasecomplex)-Nachweismethode verwendet.

20

Nachdem die Schnitte auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei 37°C luftgetrocknet wurden, folgte eine Deparaffinierung durch Xylol und eine Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe. Die endogene Peroxidase wurde durch Immersion der Schnitte für 10 min in einer Lösung von 19 ml Phosphatpuffer, 1 ml Methanol und 200 µl 30%iges  $H_2O_2$  blockiert. Anschließend wurden die Schnitte 6x 10 min mit PBS gespült.

25

Um die nicht-spezifische Antikörperbindung zu reduzieren, wurden die Schnitte mit Normalserum der Ziege vorinkubiert.

30

Danach erfolgte die Inkubierung mit dem primären Antikörper Rabbit Anti-ERG1 (HERG) (AB5222-200UL, Chemicon, Temecula, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:500 für 1 h bei 4°C. Nachdem 3x mit PBS gespült wurde, sind die Schnitte in biotinyliertem Anti-Rabbit-Antikörper (Vector) in einer Verdünnung von 1:200 für 1 h bei 25°C inkubiert worden. Anschließend wurden die Schnitte 3x mit PBS gespült. Danach folgte die Inkubierung mit dem ABC Komplex (Vector)

35

für 1 h bei 25°C. Nach mehrmaligem Spülen wurden die Schnitte für die Visualisierung des primären Antikörpers mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid

- 5 (DAB) (Sigma) für 3 min bei 25°C nach einem Standardprotokoll (0,05 % DAB in 0,1 M Phosphatpuffer und 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt.

Die Färbung der Schnitte wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Die Färbereaktion wurde durch Spülen mit PBS gestoppt.

10

Bei positiver Antikörper-Reaktion wird das betroffene Gewebeareal homogen braun angefärbt.

- 15 Nach der Immunhistochemie wurden die Schnitte über Nacht getrocknet, dehydriert und anschließend eingedeckt.

Negativ Kontrollen: gleiche Prozedur ohne Primärantikörper

- 20 Positive Kontrollen: Experimente von Anti-ERG1 (HERG)-Antikörper wurden an Schnitten des humanen Herzens durchgeführt.

### **Proliferationstest der colorektalen Karzinomzelllinie Colo-205 mit E-4031**

- 25 Die Proliferationsversuche (Wachstumsversuche) wurden mit dem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid MTT-Test durchgeführt. Die Zellen der colorektale Karzinomzelllinie Colo205 wurden mit 0,05% EDTA geerntet und anschließend ausgezählt. Die Zellen wurden dann in eine 96-Lochplatte mit je 10<sup>4</sup> lebenden Zellen pro Loch ausgesät und 24 h zum Anhaften belassen. Nach 24 h wurde das Medium mit E-4031 in verschiedenen
- 30 Konzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM ausgetauscht. Das Endvolumen war 200 µl pro Loch. Nach der Inkubation von 0 bis 7 Tagen wurden 20 µl MTT (5mg/ml in PBS) hinzugefügt und für 2 h in 37°C inkubiert. Das Medium wurde dann entfernt und 100 µl Dimethylsulfoxid (Sigma, Deutschland) wurde in jedes Loch für 10 Minuten gegeben.

35

Ein 96 Loch Mikrotiterplattenleser (Comtek, Deutschland) wurde für die Auswertung benutzt. Bei einer Wellenlänge von 570 nm Angstrom wurde der MTT-Test

- 5 in dem ELISA- Mikrotiterplattenleser abgelesen. Die durchschnittliche Konzentration wurde in jedem Set von fünf Löchern gemessen.

Die Absorption der unbehandelten Kontrollen wurden als 100 % angenommen und dementsprechend der  $IC_{50}$  berechnet.

10

### **Statistische Auswertung**

Ein Unterschied von  $P < 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

### 15 **Ergebnisse der RT-PCR**

CEA, CK-19 und CK-20 wurden im Karzinom und im Kontrollgewebe sowie in der colorektalen Zelllinie Colo-205 exprimiert. Die HERG Expression war im Gegenteil zu 100 % nur auf das Karzinomgewebe und die Colo-205-Zellen beschränkt. Wie in Abbildung 1 und Tabelle 1 dargestellt, zeigen Gewebeproben, die in der histopathologischen Untersuchung eindeutig ein colorektales Karzinom ergeben, eine Expression von allen Markern (CEA, CK-19, CK-20 und HERG). Colorektales Gewebe von Patienten ohne eine maligne Erkrankung exprimiert auch CEA, CK-19 und/oder CK-20, jedoch ließ sich HERG nie nachweisen (Tabelle 2). Wenn die RT-PCR ohne RT Enzyme durchgeführt wurde, ließen sich in der Zelllinie Colo-205 keine Banden nachweisen, was beweist, dass keine DNA vorhanden ist, und somit die RT-PCR Bedingungen sehr gut abgestimmt sind.

30 In Abbildung 1 sind in Spalten 1 und 15 100 Basenpaarstufen als Kontrollbanden dargestellt. In Spalte 2 ist die GAPDH Kontrolle zu sehen, die in allen Proben positiv war. Die Ergebnisse in den Spalten 3 bis 6 sind von einer Gewebeprobe eines Patienten mit Sigmadivertikulitis (Patient Nr. 6 in Tabelle 2) und in den Spalten 7 bis 10 von einer Gewebeprobe eines Patienten mit einem tubulovillösen Colonadenom (Patient Nr. 1 in Tabelle 2). Die Banden in den Spalten 35 11 bis 14 repräsentieren eine Gewebeprobe eines Patienten mit einem colorek-

- 5 talen Karzinom (Patient Nr. 3 in Tabelle 1). DNA Fragmente wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Wie in Tabelle 1 zusammengefasst, konnte CEA in 22 (91.7 %), CK-19 in 19 (79.2 %), CK-20 in 23 (95.8 %), und HERG exklusiv zu 100 % in allen der 24 Gewebeproben von colorektalen Karzinomen von 18 verschiedenen untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

In allen Proben, außer in der CK-19 und CK-20 Expression im Patienten Nr. 2, waren keine Unterschiede in den mRNA Resultaten der verschiedenen Gewebeproben von dem gleichen Untersuchungspräparat (Patient Nr. 4, 6, 7, 8, 9) vorhanden (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Detektion von mRNA Expression der Tumormarker CEA, CK-19, CK-20 und HERG mittels RT-PCR in colorektalen Karzinomen

Pat.	GAPDH	CEA	CK-19	CK-20	HERG	Staging – TNM	Lokalisation
1	pos	Pos	pos	pos	pos	III - T4,N1(2/10),M0	Sigmoid
2a	pos	Pos	neg	neg	pos	III - T3,N1(1/9),M0	Colon
2b	pos	Pos	pos	pos	pos		
3	pos	Pos	neg	pos	pos	II - T3,N0(0/15),M0	Colon
4a	pos	Pos	pos	pos	pos	IV - T3,N2(25/27),M1	Rektum
4b	pos	Pos	pos	pos	pos		
5	pos	Neg	pos	pos	pos	I - T2,N0(0/6),M0	Sigmoid
6a	pos	Pos	pos	pos	pos	IV - T3,N2(11/20),M1	Rektum
6b	pos	Pos	pos	pos	pos		
7a	pos	Pos	neg	pos	pos	III - T2,N1(2/12),M0	Rektum
7b	pos	Pos	neg	pos	pos		
8a	pos	Pos	pos	pos	pos	III - T3,N1(1/35),M0	Colon
8b	pos	Pos	pos	pos	pos		
9a	pos	Pos	pos	pos	pos	III - T3,N2(21/27),M0	Rektum

9b	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>		
10	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	I - T2,N0(0/10),M0	Rektum
11	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	II - T3,N0(0/4),M0	Colon
12	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	IV - T3,N2(6/16),M1	Sigmoid
13	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	II - T3,N0(0/7),M0	Rektum
14	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	II - T3,N0(0/13),M0	Colon
15	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	III - T3,N2(6/11),M0	Rektum
16	pos	Pos	pos	pos	<b>pos</b>	I - T1,N0(0/16),M0	Sigmoid
17	pos	pos	pos	pos	<b>pos</b>	III - T3,N2(6/36),M0	Rektum
18	pos	neg	neg	pos	<b>pos</b>	II - T3,N0(0/16),M0	Rektum

5

Das Grading (histopathologischer Differenzierungsgrad) der colorektalen Karzino-  
me war in allen Gewebeproben G2 außer für die Probe des Patienten Nr. 1  
(G2-3), Nr. 4 (G3) und Nr. 9 (G2-3) zu erkennen.

- 10 HERG mRNA wurde in keinem (0 %) der histopathologisch negativen colorekta-  
len Gewebeproben der 3 Patienten mit einem tubulovillösen Adenom des Co-  
lons und der 4 Patienten mit Sigmadivertikulitis, die als Negativkontrollen dien-  
ten, nachgewiesen (Abbildung 1 und Tabelle 2).
- 15 Die mRNA der Tumormarker CEA, CK-19 und CK-20 waren in allen Patienten  
mit einem Colonadenom positiv (100 %). In den Gewebeproben der Patienten  
mit Sigmadivertikulitis waren jeweils die mRNA der Marker CEA, CK-19 und  
CK-20 in 2 Patienten (50 %) positiv.

20

- 5 **Tabelle 2:** Detektion von mRNA Expression der Tumormarker CEA, CK-19, CK-20 und HERG mittels RT-PCR in histopathologisch negativem colorektalem Gewebe.

10

Pat.	GAPDH	CEA	CK-19	CK-20	HERG	Histologie	Lokalisation
1	pos	pos	Pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom	Colon
2	pos	pos	Pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom	Colon
3	pos	pos	Pos	pos	neg	tubulovillöses Adenom	Colon
4	pos	pos	Neg	neg	neg	Sigmadivertikulitis	Sigmoid
5	pos	pos	Pos	pos	neg	Sigmadivertikulitis	Sigmoid
6	pos	neg	Pos	pos	neg	Sigmadivertikulitis	Sigmoid
7	pos	neg	Neg	neg	neg	Sigmadivertikulitis	Sigmoid

### Ergebnisse der Immunhistochemie

- 15 Die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises des Anti-ERG1 (HERG) Antikörpers zeigten deutlich eine immunhistochemisch positive Reaktion durch eine Färbung der betroffenen, maligne entarteten Gewebe(drüsen)-anteile in allen Proben der colorektalen Karzinome (Tabelle 3). Die Immunreaktivität ist beschränkt auf den basalen Anteil des Zytoplasmas der Epithelzellen
- 20 (Abbildung 3 und 4). Neben den Epithelzellen findet man diffuse Reaktionen in der Lamina propria und in den Gefäßen (Blutzellen). Weiterhin findet man in den Muskelschichten vereinzelte, nicht näher charakterisierbare Zellen.

- 25 Die histopathologisch negativen restlichen Darmanteile des Resektates derselben Tumorpationen waren bei den meisten Gewebeproben immunhistochemisch negativ. Jedoch ließ sich bei den immunhistochemisch positiven Gewebeproben in den histopathologisch negativen restlichen Darmanteilen des Re-



5 sektates vereinzelt eine schwache, aber eindeutig positive Immunreaktion in  
den basalen Epithelzellen am Grund der Drüsen nachweisen (Abbildung 6). In  
einer repräsentativen Anzahl von Patienten wurde in einem Zeitraum von zwei  
Jahren nach der operativen Resektion des colorektalen Karzinoms stets ein  
locoregionäres Rezidiv (Wiederauftreten) des Karzinoms festgestellt (Patienten  
10 Nr. 19-25 in Tabelle 3).

Diese sensitive und zuverlässige immunhistochemische Detektion von HERG in  
histopathologisch noch unauffälligem Gewebe und somit der Nachweis von Mik-  
rometastasen macht HERG zu einem zuverlässigen Tumormarker.

15 Die histopathologisch negativen colorektalen Gewebeproben von benignen  
Darmveränderungen (Sigmadivertikulitis, colorektale Adenome) sowie die ge-  
sunden colorektalen Gewebeproben (regelrechte gesunde Darmschleimhaut)  
zeigten in allen Fällen keine Färbung und somit eine immunhistochemisch ne-  
20 gative Reaktion (Tabelle 4 und Abbildung 5).

**Tabelle 3:** Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse in dem colorek-  
talen Karzinomgewebe sowie in dem histopathologisch negativen restlichen  
25 colorektalen Gewebe desselben Tumorpatienten. (Unter den Patienten mit den  
durchlaufenden Nr. 1-25 sind die Patienten Nr. 1-18 der PCR enthalten.)

Pat.	Karzinomgewebe	Restliche Darmanteile des Resektates histologisch negativ
1 - 18	Pos	neg
19 - 25	Pos	pos

30

35

- 5 **Tabelle 4:** Darstellung der immunhistochemischen Ergebnisse in histopathologisch negativen Geweben. (Unter den Patienten mit den durchlaufenden Nr. 1-25 sind die Patienten mit den Nr. 1-7 der PCR enthalten.)

Pat.	Regelrechte gesunde Darmschleimhaut
1-6	neg
	<b>Sigmadivertikulitiden</b>
7-18	neg
	<b>Colorektale Adenome</b>
19-25	neg

10

### Ergebnisse des Proliferationsassays

- Abbildung 2 zeigt die Proliferationshemmung der colorektalen Karzinomzelllinie Colo-205 durch den selektiven Inhibitor E-4031 des HERG Kaliumkanales.
- 15

E-4031 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (1, 5 und 10  $\mu\text{M}$ ) zu den Zellen hinzu gegeben und dann an 5 darauf folgenden Tagen das Wachstumsverhalten der colorektalen Karzinomzellen gemessen. Die Karzinomzellen wurden durch die Konzentrationen von E-4031 in ihrem Wachstum, durch die Blockierung des für das Karzinomwachstum wichtigen HERG-Kaliumkanals, gehemmt und starben ab.

20

Durch die vorliegende Erfindung konnte somit ein Tumormarker aufgefunden werden, der verlässlich kanzerogenes (bösartiges) von nicht-kanzerogenem (gutartigem) colorektalem Gewebe unterscheiden und dadurch detektieren und des Weiteren karzinogene Tumorzellen in histopathologisch unauffälligem Gewebe nachweisen kann. Dies ist für die zuverlässige Früherkennung von Karzinomzellen in colorektalen Adenomen sowie für die sichere Erkennung von Mikrometastasen im histopathologisch unauffälligen Gewebe und in den Lymphknoten für den Therapieverlauf und Prognose von ganz besonderer Bedeutung.

25

30

- 5 CEA eignet sich nicht als ein solcher Marker, da CEA mRNA nicht in colorektalen Karzinomen im Stadium I detektiert wurde, aber in allen Gewebeproben der tubulovillösen Colonadenomen und in zwei Proben der Sigmadivertikulitis, die als Negativkontrollen fungierten, exprimiert wird. Im Einklang mit den vorgeleg-
- 10 ten Ergebnissen zeigte Bhatnagar et al. mittels quantitativer Enzymimmunoassay und Immunozytochemie, dass CEA in moderat bis sehr wenig differenzier-ten colorektalen Tumoren gar nicht vorhanden ist. Boucher et al. demonstriert, dass CEA nicht nur in Adenokarzinomen des Colons, sondern auch in gesun-
- dem angrenzendem Schleimhautgewebe des Colons vorkommt.
- 15 CK-19 and CK-20 sind nicht nur im Serum, sondern auch im colorektalen Gewebe keine verlässlichen Tumormarker. Sie lassen sich nicht in fortgeschrittenen Karzinomen im Stadium III, jedoch in einigen Kontrollengeweben, nachweisen. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, dass CK-19 und CK-20 auch in ge-
- 20 sunder Darmschleimhaut gefunden werden kann, aber auch in einigen Tumoren nicht vorhanden sind. Die Beobachtung, dass das reichliche Vorkommen von CK-19 in gut differenziertem Tumorgewebe und geringgradiger Dysplasie mit geringer Zellproliferation, als auch das geringe Vorkommen in gering differen-
- 25 ziertem Karzinomgewebe und hochgradiger Dysplasie mit einer großen Proliferationsrate, sowie die geringe Expression von CK-20 in colorektalen Karzino-
- men im Vergleich zu gesundem Colongewebe lässt vermuten, dass die negati-
- ve Tumorprobe des Stadiums III sich in einem hohen Proliferationsstatus befin-
- det. Die konträren Ergebnisse von der Gewebeprobe des Patienten Nr. 2 (Ta-
- belle 1) zeigen zusätzlich, dass die Marker nicht gleichmäßig in dem Tumor ver-
- teilt sind.
- 30 Im Gegensatz zu den Ergebnissen von CEA, CK-19 und CK-20, war eine HERG-Expression in allen colorektalen Karzinomen, unabhängig vom Tumorstadium, selektiv vorhanden und in jedem Kontrollgewebe negativ. Dies ließ sich sowohl auf molekularbiologischer Ebene durch den Nachweis der HERG-
- 35 RNA mit der PCR Methode als auch in der Immunhistochemie durch den Nachweis des HERG-Proteins selektiv in den colorektalen Karzinomzellen nachweisen.

5

In einigen histopathologisch negativen restlichen Darmanteilen des Resektates der Tumorpatienten konnte immunhistochemisch HERG positive Reaktionen nachgewiesen werden. Diese Patienten erlitten in den nachfolgenden zwei Jahren nach der operativen Resektion des Karzinoms ein locoregionäres Rezidiv des colorektalen Karzinoms. Dies ist ein Nachweis von Mikrometastasen im histopathologisch unauffälligem colorektalem Gewebe.

Durch den Nachweis von HERG mit zwei voneinander unabhängigen, sensitiven Methoden, die beide üblich sind, gewinnt die Detektionsqualität und Zuverlässigkeit enorm.

Daher ist der HERG-Kaliumkanal ein hochselektiver Tumormarker für das colorektale Gewebe.

Er ist zudem ein wertvoller Marker für andere epitheliale Karzinome, da er auch im Endometriumkarzinom vorkommt. Die vorgelegten Daten unterstützen die kürzlich auf Basis von in-vitro Studien vermutete starke Involvierung der EAG-Kaliumkanäle, den HERG Kaliumkanal mit eingeschlossen, in die Karzinogenese. Diese Kaliumkanäle sind in verschiedenen Tumorzelllinien gefunden worden, die einen transformierten Phänotyp in transfizierten Zellen von Säugtieren übertragen und Tumorprogression in immunsupprimierten Mäusen favorisieren. Da der HERG-Kaliumkanal für das Tumorwachstum und/oder das Überleben des Tumors von immenser Bedeutung ist, ließ sich in den Proliferationsstudien nachweisen, dass durch die selektive Blockade des HERG-Kaliumkanals durch E-4031 die Karzinomzellen zum Absterben gelangen. Der HERG-Kaliumkanal, als ein funktioneller Tumormarker für das colorektale Karzinom, stellt somit nicht nur einen selektiven Tumormarker dar, sondern ermöglicht auch durch die selektive Hemmung von E-4031 einen neuen Ansatz für die Krebstherapie.

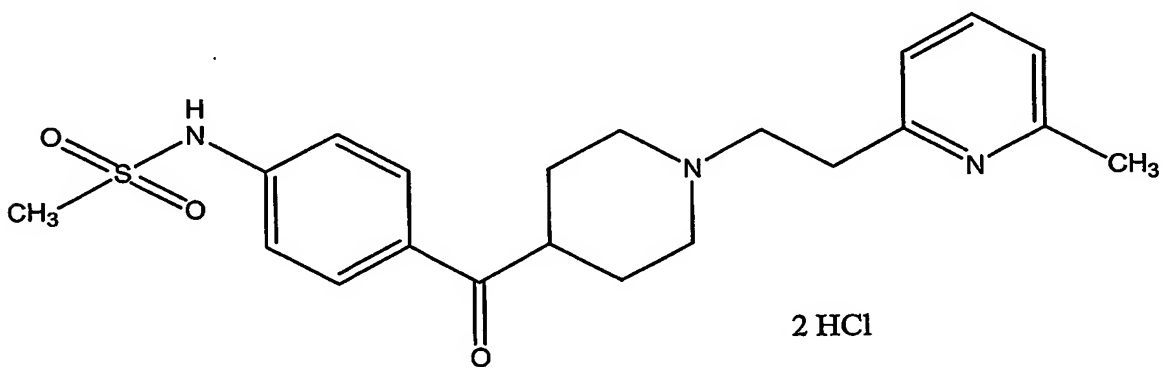
35

Die überraschenden und wertvollen Erkenntnisse der Erfindung lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass eine sichere Diagnose von colorektalen

- 5 Karzinomzellen durch selektive HERG-Genexpression in zwei voneinander unabhängigen Testverfahren (Immunhistochemie und PCR) möglich ist, wobei ein neuartiger und hochselektiver Marker in Gestalt des HERG-Kaliumkanals Verwendung findet und dass sich das Wachstum der Tumorzellen durch das Antiarrhythmikum E-4031 hemmen lässt.

## 5 Patentansprüche:

1. Diagnostikum zum Nachweis eines Karzinoms, **dadurch gekennzeichnet**, dass man damit die Anwesenheit mindestens eines HERG-Kaliumkanals in einer menschlichen Gewebeprobe oder in Lymphknoten, die  
10 beim gesunden Menschen frei von HERG-Kaliumkanälen ist, oder in Körperflüssigkeiten nachweist.
2. Verfahren zum Diagnostizieren eines Karzinoms, **dadurch gekennzeichnet**, dass man in einer Gewebeprobe oder in Lymphknoten, die beim ge-  
15 sunden Menschen frei von HERG-Kaliumkanälen ist, oder in einer Körperflüssigkeit die Anwesenheit mindestens eines HERG-Kaliumkanals nachweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass man ein colorektales Karzinom diagnostiziert, indem man in einer Gewebeprobe des  
20 menschlichen Dickdarms oder Enddarms oder in Lymphknoten mindestens einen HERG-Kaliumkanal nachweist.
4. Verwendung des Antiarrhythmikum 4-[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinyl]carbonyl]methansulfoanilid, 2HCl (E-4031) der Formel I

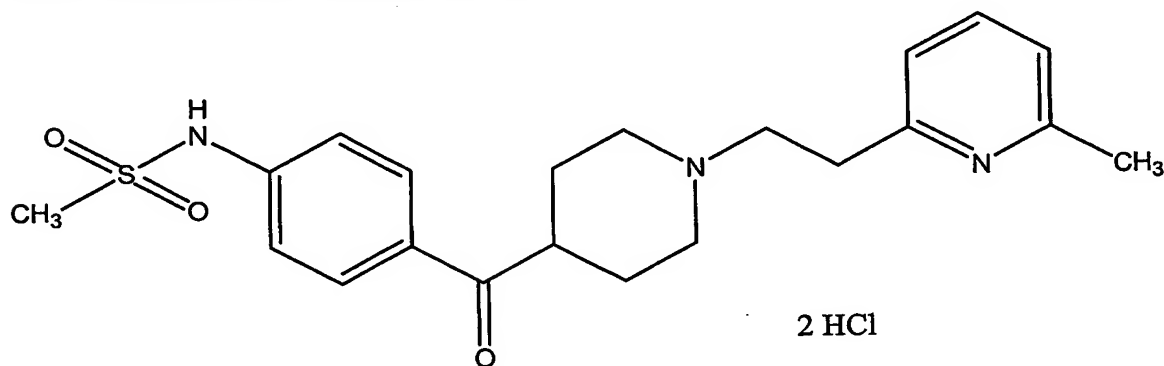


zur Behandlung eines durch die Anwesenheit eines HERG-Kaliumkanals gekennzeichneten Karzinoms.

5. Verwendung des Antiarrhythmikum 4-[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl]-4-piperidinyl]carbonyl]methansulfoanilid, 2HCl (E-4031) der Formel I zur Herstel-  
30

5 lung eines Arzneimittels zur Behandlung eines durch die Anwesenheit eines HERG-Kaliumkanals gekennzeichneten Karzinoms.

6. Verwendung des Antiarrhythmikum 4-[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl-4-piperidiny]carbonyl]methansulfoanilid, 2HCl (E-4031) der Formel I

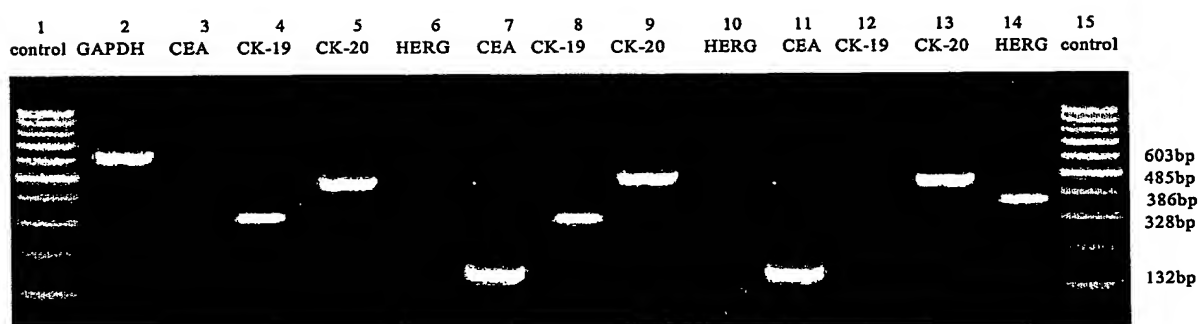


zur Behandlung des colorektalen Karzinoms.

7. Verwendung des Antiarrhythmikum 4-[1-[2-(6-Methyl-2-pyridinyl)ethyl-4-piperidiny]carbonyl]methansulfoanilid, 2HCl (E-4031) der Formel I zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung des colorektalen Karzinoms.

15

Abb. 1

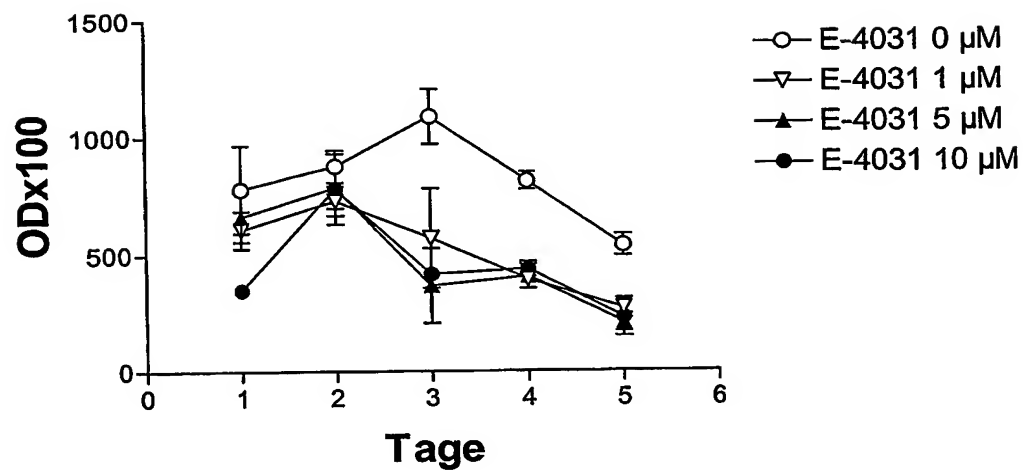


RT-PCR zur Darstellung der CEA, CK-19, CK-20 und HERG mRNA Expression  
in gesundem Colongewebe, in tubulovillösen Colonadenomen und in  
colorektalen Karzinomen.



Abb. 2

**Vermehrung von Colo 205  
Zellen in Anwesenheit des  
HERG-Blockers E-4031  
Initiale Aussaat 10.000 Zellen pro well**



Darstellung der Proliferationshemmung der colorektalen Karzinomzelllinie Colo-205 durch den selektiven Inhibitor E-4031 des HERG Kaliumkanals.

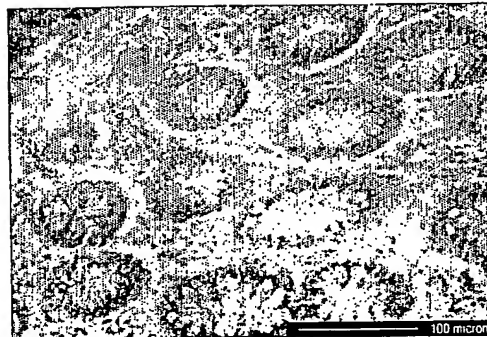
**Abb 3-6:****Abb. 3****Abb. 4**

Abbildung 3 und 4: immunhistochemisch positive Reaktion des Anti-ERG1 (HERG) Antikörpers im colorektalen Karzinom.

**Abb. 5**

Immunhistochemisch negative Reaktion im regelrechten gesunden colorektalen Gewebe.

**Abb. 6**

Immunhistochemisch positive Reaktion im histopathologisch unauffälligen restlichen Darmanteil des Resektates des Tumorpatienten mit späterem locoregionären Rezidiv des Karzinoms.